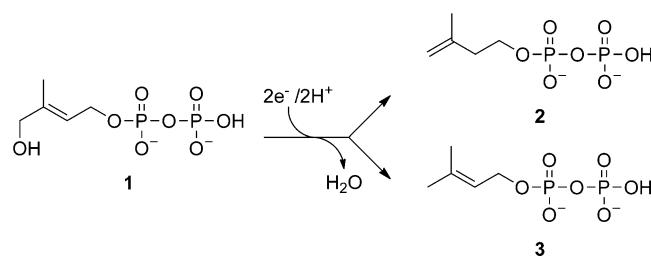


# Fluor-, Amino- und Thiolinhibitoren im Komplex mit dem $[Fe_4S_4]$ -Protein IspH<sup>\*\*</sup>

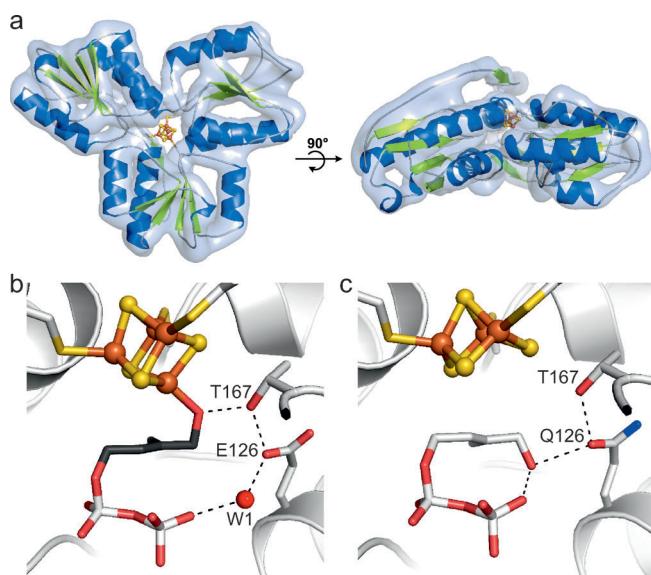
Ingrid Span,\* Ke Wang, Weixue Wang, Johann Jauch, Wolfgang Eisenreich, Adelbert Bacher, Eric Oldfield und Michael Groll\*

Isoprenoide leiten sich von zwei universellen Vorläufern ab: Isopentenyldiphosphat (IPP) und Dimethylallyldiphosphat (DMAPP).<sup>[1]</sup> In Säugetieren werden diese Intermediate, die für das Überleben der Zelle essentiell sind und unter anderem in der Cholesterolsynthese eine wichtige Rolle spielen, über den Mevalonatweg gewonnen. Andererseits werden sie in den meisten Bakterien sowie in Malariaerreger wie *Plasmodium falciparum* über den 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat-Weg (DXP-Weg) hergestellt.<sup>[2]</sup> Dieser kommt beim Menschen nicht vor und wird deshalb als vielversprechender Angriffspunkt für die Bekämpfung zahlreicher Infektionskrankheiten angesehen.<sup>[3]</sup>

Schema 1 zeigt die letzte Stufe des DXP-Biosynthesewegs, in dem die Umsetzung von (E)-4-Hydroxy-3-methylbut-2-enyldiphosphat (HMBPP, **1**) zu einem Gemisch von IPP (**2**) und DMAPP (**3**) stattfindet. Diese Reaktion wird von der HMBPP-Reduktase (IspH-Protein) katalysiert. Das monomere Enzym besteht aus drei Domänen, die im aktiven Zentrum einen redoxaktiven  $[Fe_4S_4]$ -Cluster binden (Abbildung 1a).<sup>[4]</sup> Der Cluster ist über die Seitenketten dreier Cysteine an das Protein gebunden; dabei behält eines der Eisen-



**Schema 1.** Reduktive Dehydratisierung katalysiert durch IspH.



**Abbildung 1.** Kristallstruktur von IspH in Komplex mit **1**. a) Vorder- und Seitenansicht der Gesamtstruktur von IspH aus *E. coli*. Aktives Zentrum mit b) dem Alkoxidkomplex aus Wildtyp-IspH mit **1** und c) mit der cyclischen Ligandkonformation im IspH-E126Q-Mutantenprotein, das in der Struktur einen  $[Fe_3S_4]$ -Cluster aufweist.

[\*] Dr. I. Span, Priv.-Doz. Dr. W. Eisenreich, Prof. Dr. A. Bacher, Prof. Dr. M. Groll  
Center for Integrated Protein Science Munich, Chemie Department, Technische Universität München  
Lichtenbergstraße 4, 85747 Garching (Deutschland)  
E-Mail: ingrid.span@mytum.com  
michael.groll@mytum.de  
Homepage: <http://www.biochemie.ch.tum.de>

Dr. K. Wang, Prof. Dr. E. Oldfield  
Department of Chemistry, University of Illinois  
600 South Mathews Avenue, Urbana, IL 61801 (USA)

Dr. W. Wang, Prof. Dr. E. Oldfield  
Center for Biophysics and Computational Biology  
University of Illinois  
607 South Mathews Avenue, Urbana, IL 61801 (USA)

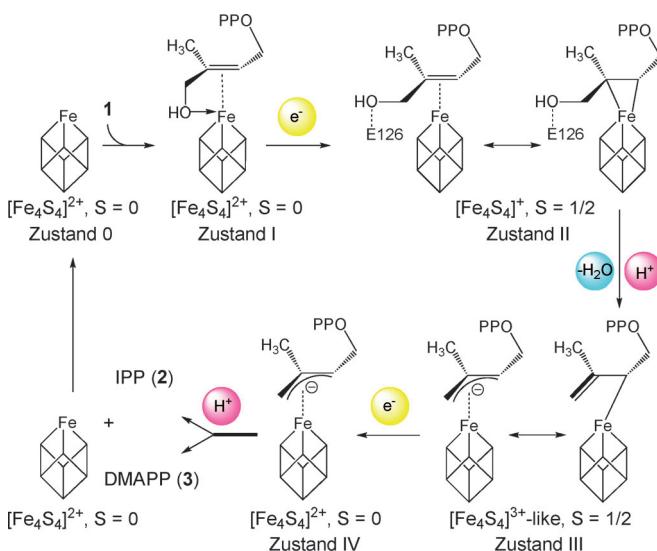
Prof. Dr. J. Jauch  
Organische Chemie II, Universität des Saarlandes  
Postfach 151150, 66041 Saarbrücken (Deutschland)

[\*\*] Diese Arbeit wurde von der Hans-Fischer-Gesellschaft, der DFG (GR1861/5-1), der American Heart Association, Midwest Affiliate Predoctoral Fellowship (10PRE4430022) und den National Institutes of Health (NIH) (GM065307) unterstützt. Wir danken Dr. Florian Kraus für seinen wertvollen Beitrag zum Manuscript und David Hartmann für die Synthese des Fluoranalogs von HMBPP. Weiterhin danken wir den Mitarbeitern der X06SA-Beamline am Paul-Scherrer-Institut (Swiss Light Source, Villigen, Schweiz) für die Unterstützung bei der Datensammlung.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201208469> zu finden.

ionen eine freie Koordinationsstelle, die nicht durch einen Aminosäurerest besetzt wird. Untersuchungen des Reaktionsmechanismus mit IspH aus *Escherichia coli* sowie Proteinmutanten zeigten, dass **1** im aktiven Zentrum zwei verschiedene Konformationen einnehmen kann (Abbildung 1b und c). In einer der beiden Konformationen bindet das Ligandatom O1 an das vierte Eisenion, in der anderen geht es zahlreiche Wasserstoffbrückenbindungen mit der Diphosphatgruppe sowie den Proteinresten ein.<sup>[5]</sup>

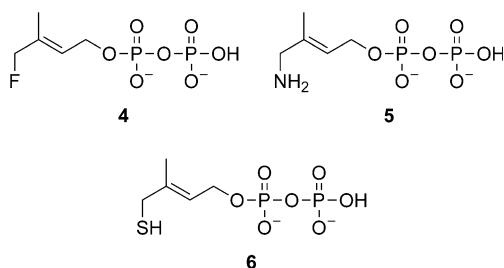
Der vorgeschlagene Mechanismus für die IspH-Reaktion ist in Schema 2 dargestellt und umfasst vier intermediäre Zustände, die durch Kristallographie, Mößbauer-Spektro-



**Schema 2.** Vorgeschlagener Mechanismus für die IspH-Reaktion.

skopie und paramagnetische Elektronenresonanz(EPR)-Spektroskopie identifiziert wurden.<sup>[5,6]</sup> Die Struktur von IspH in Abwesenheit exogener Liganden ist nicht bekannt (Zustand 0). Durch die Bindung von **1** an oxidiertes IspH entsteht ein Alkoxidkomplex mit schwachen  $\pi$ -Wechselwirkungen (Zustand I, Spin  $S = 0$ ). Aufgrund der Einelektronenreduktion des Clusters, die zur Entstehung von  $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{+}$  mit Spin  $S = 1/2$  führt, rotiert die Hydroxymethylgruppe des Liganden vom Cluster weg und nimmt eine cyclische Konformation ein (Zustand II). Dies hat einen gravierenden Einfluss auf den stereochemischen Verlauf der IspH-Reaktion.<sup>[7]</sup> Die Zweielektronenübertragung vom Kofaktor auf das Substrat führt zu einem HiPIP-artigen  $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{3+}$ -Cluster, zum Bruch der C-O-Bindung und zur Wasserabspaltung. Im weiteren Verlauf abstrahiert das Allylanion (Zustand III) ein Proton von der Diphosphatgruppe. Die Protonierung erfolgt entweder am C2- oder C4-Atom des Liganden, wobei die Produkte IPP und DMAPP gebildet werden.

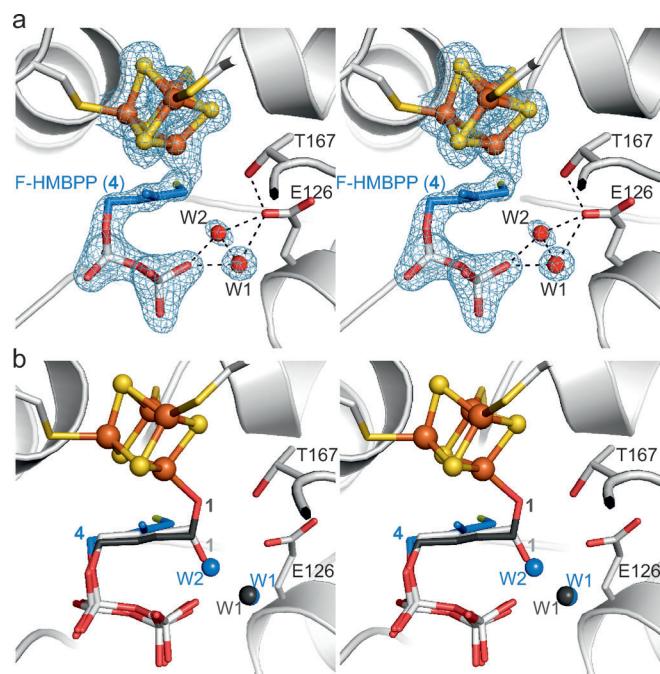
Über Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus von IspH hinaus wurde intensiv an der Entwicklung und Charakterisierung von Inhibitoren gearbeitet.<sup>[8]</sup> Kürzlich wurde über die Synthese und spektroskopische Untersuchung von drei Substratanaloga mit Fluor- (4),<sup>[9]</sup> Amin- (5)<sup>[10]</sup> oder Thiolsubstituenten (6) anstelle der Hydroxygruppe in HMBPP berichtet (Schema 3). IspH setzt **4** langsam um, **5** und **6** hingegen hemmen die Enzymaktivität. Um die Struk-



**Schema 3.** Strukturanaloga des IspH-Substrats 1.

tur-Wirkungs-Beziehung dieser Derivate zu untersuchen, wurden **4**,<sup>[11]</sup> **5**<sup>[12]</sup> und **6** synthetisiert (siehe Hintergrundinformationen), und ihre Strukturen in Komplex mit *E. coli*-IspH wurden durch Röntgenkristallographie bestimmt.

Die Struktur von IspH im Komplex mit dem Fluoranalogen **4** wurde mit einer Auflösung von 1.8 Å bestimmt [ $R_{\text{free}} = 23.2\%$ , Abbildung 2a, Protein Data Bank (PDB)<sup>[13]</sup>]

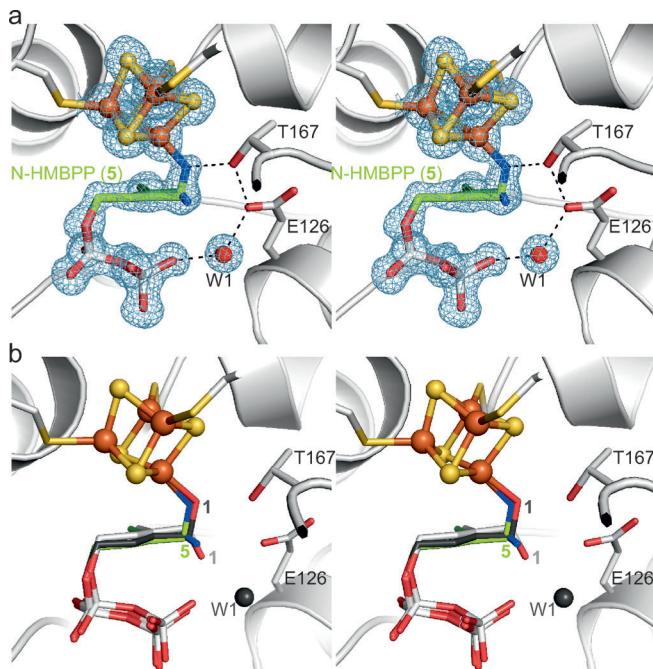


**Abbildung 2.** IspH-Komplexstrukturen mit dem Fluorderivat 4. a) Aktives Zentrum von IspH mit dem gebundenen Liganden und zwei Wasserstoffmolekülen. Eine ( $2F_0 - F_2$ )-Elektronendichtheckarte (blaues Netz, konturiert bei  $1.0 \sigma$ ) ist für die  $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Cluster, Liganden und Lösungsmittelmoleküle in der ersten Koordinationsphäre dargestellt; gestrichelte Linien deuten Wasserstoffbrücken an. b) Strukturüberlagerung von IspH:4 mit dem Alkoxidkomplex (IspH:1) und dem cyclischen Intermediat (IspH E126O:1).

ID 4H4C] und zeigt, dass **4** im aktiven Zentrum von IspH in einer ähnlichen Weise wie das Substrat **1** bindet,<sup>[14]</sup> wobei die C-F-Bindung im Vergleich zu der C-O-Bindung im IspH:**1**-Komplex um 106° gedreht ist (Abbildung 2b). Dadurch befindet sich das Fluoratom in einer hydrophoben Tasche, in der es durch Van-der-Waals-Wechselwirkungen mit His74C<sup>β</sup> (3.6 Å), Ala73C (3.9 Å) und Ala73C<sup>β</sup> (3.9 Å) stabilisiert werden kann. Diese bislang noch nicht beobachtete Konformation erlaubt zwei Wassermolekülen die Besetzung der Positionen W1 und W2. Obwohl **4** eine ungewöhnliche Orientierung einnimmt, kann es durch IspH mit einer ( $k_{\text{cat}} = 28 \text{ min}^{-1}$ ) im Vergleich zu **1** verringerten Reaktionsgeschwindigkeit ( $k_{\text{cat}} = 604 \text{ min}^{-1}$ ) zu **2** und **3** umgesetzt werden. Die Unterschiede in den Reaktionsgeschwindigkeiten lassen sich vermutlich auf die höhere Bindungsgenergie von C-F gegenüber C-O zurückführen.<sup>[15]</sup> Darüber hinaus führt die fehlende Interaktion mit dem apikalen Eisenatom zu einem erhöhten  $K_m$ -Wert von **4** ( $K_m = 104 \mu\text{M}$ ) im Vergleich zu **1** ( $K_m = 20 \mu\text{M}$ ).

Neueste Inhibitionsstudien haben gezeigt, dass die Amino- und Thiolsubstratanaloga **5** und **6** eine vielversprechende Hemmung von IspH mit  $IC_{50}$ -Werten von  $0.15 \mu\text{M}$  und  $0.21 \mu\text{M}$  aufweisen.<sup>[10]</sup> Zudem ergaben Mößbauer-spektroskopische Untersuchungen, dass beide Liganden mit dem  $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Cluster wechselwirken. Allerdings ist es fraglich, ob **5** mit seiner Aminogruppe an das vierte Eisenatom bindet oder ob ein alternativer Komplex gebildet wird, welcher die Koordination eines Wassermoleküls an das vierte Eisenatom ermöglicht. Dies konnte bereits bei Acetyleninhibitoren beobachtet werden.<sup>[8c]</sup>

Die Struktur des IspH:**5**-Komplexes wurde mit einer Auflösung von  $1.35 \text{ \AA}$  bestimmt ( $R_{\text{free}} = 21.0\%$  Abbildung 3 a, PDB<sup>[13]</sup> ID 4H4D) und zeigt eindeutig zwei Ligandkonfor-



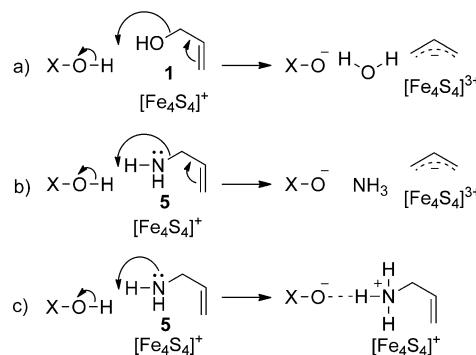
**Abbildung 3.** Röntgenstruktur von IspH im Komplex mit der Aminverbindung **5**. a) Aktives Zentrum mit dem Liganden in zwei Orientierungen. Die Elektronendichtheckarte ist analog zu Abbildung 2a dargestellt. b) Überlagerung der IspH:**5**-Struktur mit dem Alkoxidkomplex in IspH:**1** und dem cyclischen Intermediat in IspH E126Q:**1**.

mationen im gleichen Kristall:<sup>[16]</sup> 1) einen Liganden-Cluster-Komplex, in dem die Aminogruppe die freie Koordinationsstelle am Eisenatom besetzt, und 2) eine Orientierung, in der die Aminogruppe um etwa  $74^\circ$  in die zu **4** entgegengesetzte Richtung gedreht ist. Der Amin-Eisen-Komplex weist Ähnlichkeiten zum Alkoxid-Komplex IspH:**1** auf (Abbildung 3b). Dies lässt Rückschlüsse auf eine mit der Hydroxygruppe vergleichbare Affinität des Aminsubstituenten zum  $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$ -Cluster zu. Die zweite, in der Kristallstruktur beobachtete Konformation wird durch Wasserstoffbrücken zwischen der Amino- oder Ammoniumgruppe zu einem der Diphosphatsauerstoffatome ( $2.8 \text{ \AA}$ ), Glu126O<sup>e</sup> ( $2.9 \text{ \AA}$ ), Thr167O<sup>y</sup> ( $3.1 \text{ \AA}$ ) sowie einem Wassermolekül in W1-Position ( $3.1 \text{ \AA}$ ) stabilisiert.

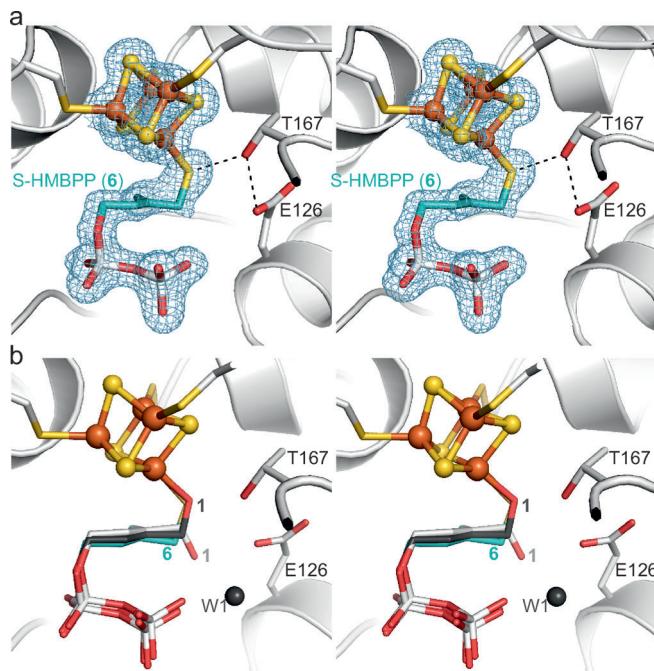
Der Amin-Eisen-Komplex ist im Einklang mit den Mößbauer-spektroskopischen Daten, die auf eine tetraedrische

(3S/N) Koordinationssphäre des vierten Eisenatoms hinweisen.<sup>[10]</sup> Somit erscheint die alternative Orientierung als Folge der Reduktion des Clusters durch die Röntgenbestrahlung – ein Befund, der vor allem interessant ist im Zusammenhang mit der IspH-Hemmung, die unter reduzierenden Bedingungen beobachtet wird.<sup>[17]</sup> Im Gegensatz zu **1** wurde jedoch kein Umsatz von **5** beobachtet. Eine plausible Erklärung hierfür ist die Bildung eines stabilen Ammoniumcarboxylationenpaares, welches die Freisetzung von Ammoniak verhindert (Schema 4).

Die Kristallstruktur von IspH im Komplex mit **6** zeigt bei einer Auflösung von  $1.7 \text{ \AA}$  ( $R_{\text{free}} = 21.3\%$ , Abbildung 4a,



**Schema 4.** Hypothetischer Mechanismus der IspH-katalysierte Reaktion mit **1** und deren Hemmung durch **5**. a) Dehydratisierung von **1**, erleichtert durch einen Protonendonator (Glu126OH oder Diphosphatgruppe, dargestellt durch X-OH). b) Entsprechende Reaktion mit **5**. c) Bildung eines stabilen Ammoniumcarboxylationenpaares.



**Abbildung 4.** Die Thiolverbindung **6** gebunden im aktiven Zentrum von IspH. a) Thiol-Eisen-Komplex. Die Elektronendichtheckarte ist analog zu Abbildung 2a dargestellt. b) Überlagerung der IspH:**6**-Struktur mit dem Alkoxidkomplex (IspH:**1**) und dem cyclischen Intermediat (IspH E126Q:**1**).

PDB<sup>[13]</sup> ID 4H4E) eine Komplexbildung zwischen dem vierten Eisenion des Clusters und der Thiolgruppe von **6**. Das aktive Zentrum enthält kein Wassermolekül, da der erhöhte Raumbedarf der verbrückenden Gruppe die Verschiebung des Kohlenwasserstoffgerüsts von **6** in Richtung der Diphosphatgruppe bewirkt; außerdem stehen keine Partner für die Stabilisierung von Wassermolekülen durch H-Brücken zur Verfügung (Abbildung 4b). Durch die Besetzung der freien Koordinationsstelle des Eisenions mit einer Thiolgruppe entsteht ein  $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Cluster mit vier Schwefelliganden an jedem Eisenion, der charakteristisch ist für eine Vielzahl von Elektronentransferproteinen.<sup>[18]</sup>

Zusammenfassend eröffnen die hier vorgestellten Ergebnisse neue Einblicke in den Mechanismus der IspH-Reaktion mit dem nicht-natürlichen Substrat **4**, die über ein bislang unbekanntes Intermediat verläuft, welches nicht an den  $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Cluster bindet. Im Gegensatz dazu binden die Amino- und Thioderivate (**5** bzw. **6**) beide an das vierte Eisenion. Die Frage, ob die Hemmung des IspH-Enzyms auf der Bindung dieser Liganden an das oxidierte oder reduzierte Protein bzw. an beide Zustände beruht, bleibt offen. Bei dem Komplex von IspH mit **5** identifizierten wir eindeutig eine zweite Konformation, in der die Seitenkette keine Wechselwirkung mit dem Cluster eingeht. Dies erklären wir mit der Bildung eines inerten Ionenpaares mit  $\text{Glu126O}^{\text{e}}$  und der Diphosphatgruppe. Erwartungsgemäß zeigt die IspH:**6**-Komplexstruktur, dass der Ligand über sein Schwefelatom an das vierte Eisenion koordiniert, wobei keinerlei Alternativkonformation beobachtet wurde. Dies beruht möglicherweise auf der Tatsache, dass die Thiolgruppe eine schwache Base und ein schlechter Wasserstoffbrückenakzeptor ist. Die Kristallstrukturen dieser Substratanaloga liefern somit nicht nur neue Einblicke in den Reaktionsmechanismus, sondern eröffnen darüber hinaus neue Strategien für die Entwicklung neuartiger Antibiotika sowie Malariaaktivstoffe.

Eingegangen am 21. Oktober 2012  
Online veröffentlicht am 10. Januar 2013

**Stichwörter:** Bioanorganische Chemie · IspH · LytB · Metalloenzyme · Terpenoide

- [1] L. Ruzicka, *Cell. Mol. Life Sci.* **1953**, *9*, 357–367.  
 [2] a) K. Bloch, *Steroids* **1992**, *57*, 378–383; b) M. Rohmer, M. Knani, P. Simonin, B. Sutter, H. Sahm, *Biochem. J.* **1993**, *295* (Pt 2), 517–524.  
 [3] F. Diederich, *Chimia* **2008**, *62*, 226–230.  
 [4] a) I. Rekittke, J. Wiesner, R. Rohrich, U. Demmer, E. Warkentin, W. Xu, K. Troschke, M. Hintz, J. H. No, E. C. Duin, E.

Oldfield, H. Jomaa, U. Ermler, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 17206–17207; b) T. Gräwert, F. Rohdich, I. Span, A. Bacher, W. Eisenreich, J. Eppinger, M. Groll, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 5867–5870; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 5756–5759; c) W. Xu, N. S. Lees, D. Hall, D. Welideniya, B. M. Hoffman, E. C. Duin, *Biochemistry* **2012**, *51*, 4835–4849.

- [5] a) T. Gräwert, I. Span, W. Eisenreich, F. Rohdich, J. Eppinger, A. Bacher, M. Groll, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 1077–1081; b) I. Span, T. Gräwert, A. Bacher, W. Eisenreich, M. Groll, *J. Mol. Biol.* **2012**, *416*, 1–9.  
 [6] W. Wang, K. Wang, I. Span, J. Jauch, A. Bacher, M. Groll, E. Oldfield, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 11225–11234.  
 [7] C. A. Citron, N. L. Brock, P. Rabe, J. S. Dickschat, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 4129–4133; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 4053–4057.  
 [8] a) K. Wang, W. Wang, J. H. No, Y. Zhang, E. Oldfield, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 6719–6727; b) W. Wang, K. Wang, Y. L. Liu, J. H. No, J. Li, M. J. Nilges, E. Oldfield, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 4522–4527; c) I. Span, K. Wang, W. Wang, Y. Zhang, A. Bacher, W. Eisenreich, K. Li, C. Schulz, E. Oldfield, M. Groll, *Nat. Commun.* **2012**, *3*, 1042.  
 [9] a) Y. Xiao, Z. K. Zhao, P. Liu, J. Am. Chem. Soc. **2008**, *130*, 2164–2165; b) Y. Xiao, W. C. Chang, H. W. Liu, P. Liu, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 5912–5915.  
 [10] A. Ahrens-Botzong, K. Janthawornpong, J. A. Wolny, E. N. Tambou, M. Rohmer, S. Krasutsky, C. D. Poulter, V. Schüemann, M. Seemann, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 12182–12185; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 11976–11979.  
 [11] V. J. Davisson, A. B. Woodside, T. R. Neal, K. E. Stremler, M. Muehlbacher, C. D. Poulter, *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 4768–4779.  
 [12] D. Das, Z. Tnimov, U. Nguyen, G. Thimmaiah, H. Lo, D. Abankwa, Y. Wu, R. Goody, H. Waldmann, K. Alexandrov, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 674–683.  
 [13] F. C. Bernstein, T. F. Koetzle, G. J. Williams, E. F. Meyer, Jr., M. D. Brice, J. R. Rodgers, O. Kennard, T. Shimanouchi, M. Tasumi, *Eur. J. Biochem.* **1977**, *80*, 319–324.  
 [14] Die Kristallstruktur des IspH:**4**-Komplexes zeigt eine Überschusselektronendichte (schätzungsweise 10%) zwischen dem Fluoratom und dem vierten Eisenatom, die auf partielle Hydrolyse zu **1** während der Kristallisation führt und **1** folglich an den Eisenschwefelcluster koordiniert.  
 [15] D. O'Hagan, *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 3689–3699.  
 [16] Bei der Röntgenkristallographie wird die Bestimmung der Atomkoordinaten ermöglicht durch Mittelung über eine Vielzahl von Molekülen. Die Struktur des IspH:**5**-Komplexes zeigt zwei Ligandkonformationen im gleichen Kristall, was bedeutet, dass ein Teil des Ensembles die eine Konformation einnimmt, wohingegen der andere Teil des Ensembles eine andere Konformation aufweist.  
 [17] Es gilt zu berücksichtigen, dass die Reduktion des  $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Clusters durch Röntgenstrahlung bei 100 K bereits bei der IspH:**1**-Komplexstruktur beobachtet wurde.  
 [18] a) H. Beinert, R. H. Holm, E. Munck, *Science* **1997**, *277*, 653–659; b) D. C. Johnson, D. R. Dean, A. D. Smith, M. K. Johnson, *Annu. Rev. Biochem.* **2005**, *74*, 247–281.